

PCT/EP

9-5-00859

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

08-702718



Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in 13342 Berlin hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung
in Pflanzen"

am 9. März 1994 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 N 15/82, C 12 N 15/29, C 12 N 9/88, A 01 H 3/04, A 01 H 5/00, C 07 H 21/04 und C 07 K 16/415 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. März 1995

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Röske

Aktenzeichen: P 44 08 629.6

Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie DNA-Sequenzen und neue Plasmide, enthaltend diese DNA-Sequenzen, die bei Integration in ein pflanzliches Genom die Aktivität der Citrat-Synthase in der Pflanze verändern. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung dieser DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase hervorgerufen werden.

Bedingt durch den kontinuierlich steigenden Nahrungsmittelbedarf, der aus der ständig wachsenden Weltbevölkerung resultiert, ist eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Steigerung des Ertrages von Nutzpflanzen zu bemühen. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, besteht in der Veränderung des Metabolismus der Pflanzen.

Das Wachstum, die Entwicklung und der Ertrag einer Nutzpflanze hängt von der Energie ab, die diese Pflanze durch Bildung von Kohlenhydraten während der Photosynthese gewinnt. Die primären Orte für die Photosynthese sind das Blatt und zu einem geringen Ausmaß das Stammgewebe. Andere Organe der Pflanze, wie Wurzeln, Samen und Knollen tragen nicht wesentlich zur Produktion von Photoassimilaten bei, sondern sind im Gegenteil in ihrem Wachstum von der Versorgung durch photosynthetisch aktive Organe abhängig. Die photosynthetisch aktiven Gewebe werden als Quellen oder "sources" bezeichnet. Sie werden als Nettoexporteure des während der Photosynthese fixierten CO₂ definiert. Die photosynthetisch inaktiven Teile der Pflanze werden als Senken oder "sinks" bezeichnet. Sie werden als Nettoimporteure des photosynthetisch fixierten Kohlendioxids definiert.

Die Samen einer Pflanze beispielsweise sind völlig von der Photosyntheseleistung der "sources" abhängig, d.h. von der Verteilung der in den "sources" gebildeten Photoassimilate. Ein Eingriff in den Metabolismus einer Pflanze, der die Verteilung der Photoassimilate verändert, kann daher von ganz entscheidender Bedeutung für den Ertrag einer Pflanze sein.

Im Fall der Kartoffel ist es beispielsweise wünschenswert, den Metabolismus der Pflanze dahingehend zu verändern, daß es zu einem möglichst effizienten Transport der Photoassimilate in die Speicherorgane, die Knollen, und zu einer möglichst maximalen Synthese von Stärke in den Knollen kommt.

Da die Vermehrung der Kartoffelpflanzen für landwirtschaftliche Zwecke in erster Linie vegetativ über Kartoffelknollen und nicht über Samen erfolgt, ist die Bildung von Blüten, d.h. potentiellen "sinks", die mit den Knollen um die gebildeten Photoassimilate konkurrieren, bei Kartoffelpflanzen, die lediglich für die Bereitstellung von Kartoffelknollen zur Stärkeproduktion vorgesehen sind, nicht notwendig.

Eine gezielte Inhibierung der Blütenbildung ist jedoch bei den meisten Pflanzen bisher nicht möglich, da der Prozeß der Induktion der Blütenbildung bei Pflanzen insgesamt noch nicht sehr gut verstanden ist. Als Induktoren der Blütenbildung werden verschiedene Substanzen wie z.B. Kohlenhydrate, Cytokinine, Auxin, Polyamine und Calcium diskutiert. Insgesamt ergibt sich aber der Eindruck, daß es sich bei der Blühinduktion um einen komplexen Vorgang handelt, bei dem mehrere bisher noch nicht eindeutig identifizierte Faktoren zusammenwirken (Bernier et al. (1993) Plant Cell 5:1147-1155).

Die Inhibierung der Blütenbildung bei Zuckerrohr, die zu einer erheblichen Steigerung des Zuckerertrages führt, ist möglich durch die exogene Applikation verschiedener synthetischer Wachstumsregulatoren (Monuron, Diuron, Diquat). Doch auch wenn durch den Einsatz derartiger synthetischer Wachstumsregulatoren die gewünschte Ertragssteigerung erreicht werden kann, so ist doch eine sorgfältige Abwägung von Nutzen und Schaden bei der Verwendung derartiger synthetischer Stoffe angeraten. Neben den sehr hohen Kosten, die meistens mit der Anwendung synthetischer Stoffe verbunden sind, gilt es insbesondere, die Auswirkungen auf die Umwelt durch biologisch nicht abbaubare oder nur bedingt abbaubare Stoffe zu berücksichtigen. Da in der Regel nur unzureichendes Wissen über die Umweltverträglichkeit vieler synthetischer Wachstumsregulatoren besteht, bringt eine umfangreiche Anwendung dieser Substanzen in der Landwirtschaft immer ein erhebliches Risiko bezüglich der Langzeitwirkung auf die Umwelt mit sich.

Es erscheint daher wünschenswert, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die eine gezielte Inhibition der Blütenbildung bei verschiedenen Nutzpflanzen unter Vermeidung der Anwendung synthetischer Substanzen erlauben.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, bei der es aufgrund einer Veränderung der Aktivität eines Enzyms, das an respiratorischen Prozessen in den Zellen beteiligt ist, zu einer Veränderung des Blühverhaltens derartig veränderter Pflanzen führt.

Respiratorische Prozesse spielen wie in Tieren auch in Pflanzen eine essentielle Rolle bei der Versorgung der Zellen mit Energie zur Aufrechterhaltung ihres Metabolismus. Hierbei werden durch den Abbau organischer Substrate (Zucker, Fette oder Proteine), in dessen Verlauf Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff übertragen wird, energiereiche Verbindungen, in erster Linie ATP, hergestellt. Diese können anschließend für biosynthetische Prozesse im Rahmen von Wachstums- und Entwicklungsprozessen verwendet werden.

Eine zentrale Rolle bei dem Abbau von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Aminosäuren sowie bei der Bereitstellung von Ausgangssubstanzen für viele Biosynthesereaktionen spielt in pflanzlichen wie in tierischen Zellen der Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus, Zitronensäure-Zyklus, Krebs-Zyklus), der in den Mitochondrien der Zellen abläuft.

In diesen Zyklus wird das Zwischenprodukt Acetyl-CoenzymA, das sowohl beim Abbau von Kohlenhydraten über die Glykolyse, als auch beim Abbau von Fettsäuren durch die β -Oxidation entsteht, eingeschleust und im Verlauf des Zyklus in Kohlendioxid und reduzierte Coenzyme (NADH, FADH₂) umgewandelt.

Das Enzym, das für den Eintritt des Acetyl-CoAs in den TCA-Zyklus verantwortlich ist, ist die Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.). Dieses Enzym katalysiert die Aldolkondensation von Acetyl-CoenzymA und Oxalacetat zu Citrat unter Freisetzung von reduziertem CoenzymA. Die Citrat-Synthase nimmt innerhalb des Stoffwechsels eine zentrale Stellung ein, da die von diesem Enzym katalysierte Reaktion essentiell ist für die Einschleusung des Substrats Acetyl-CoenzymA

in den Citrat-Zyklus. Entsprechend der Schlüsselstellung, die dieses Enzym im Metabolismus der Zelle einnimmt, wird seine Aktivität in vielfältiger und komplexer Art und Weise reguliert.

Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Citrat-Synthase fanden bisher schwerpunktmäßig bei Prokaryonten, Pilzen und Tieren statt. So sind beispielsweise bereits bei einer Reihe von Prokaryonten Gene beschrieben, die für Citrat-Synthase kodieren, z.B. bei *E.coli*, *Acinetobacter anitratum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia prowazekii*, *Bacillus sp.* (Schendel et al. (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:335-345 und Referenzen darin), *Coxiella burnetii* (Heinzen et al. (1991) Gene 109:63-69) und *Haloferax volcanii* (James et al. (1992) Biochem. Soc. Trans. 20:12). Ebenso sind bereits bei *Saccharomyces cerevisiae* (Suissa et al. (1984) EMBO J. 3:1773-1781) und *Neurospora crassa* (Ferea et al. (1994), Mol. Gen. Genet. 242:105-110) derartige Gene bekannt. Bei Tieren ist lediglich das Gen für die Citrat-Synthase aus Schwein bekannt (Bloxham et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5381-5385).

Pflanzliche Citrat-Synthasen sind bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht worden. Lediglich in wenigen Fällen wurde das Enzym angereinigt, z.B. aus Blättern von *Pisum sativum* (Unger und Vasconcelos (1989) Plant Physiol. 89:719-723) oder Ricinus-Sämlingen (Kagawa und Gonzalez (1981) Plant Physiol. 68:845-850). Und nur in einem einzigen Fall, bei *Arabidopsis thaliana*, wurde bisher eine cDNA-Sequenz isoliert, die für eine pflanzliche Citrat-Synthase kodiert (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:411-418).

Angesichts der Bedeutung der Citrat-Synthase für den Metabolismus der Zelle ist fraglich, ob Pflanzen eine Reduktion oder Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in allen oder in bestimmten Organen tolerieren. Insbesondere ist nicht bekannt, ob es möglich ist, transgene Pflanzen mit einer reduzierten Citrat-Synthaseaktivität herzustellen. Für die Herstellung von Pflanzen mit reduzierter Citrat-Synthaseaktivität ist es notwendig, Citrat-Synthase-Kodierregionen solcher Pflanzenspezies zur Verfügung zu stellen, mit denen transgene Pflanzen in großer Anzahl erzeugt werden können. Eine Pflanzenspezies, die dieser Anforderung gerecht wird, ist *Solanum tuberosum*. Die genetische Veränderung von *Solanum tuberosum* durch Agrobakterien vermittelten Gentransfer ist ausreichend beschrieben (Fraley et al. (1985) Crit. Rev. Plant. Sci. 4:1-46).

Es wurde nun überraschend gefunden, daß eine starke Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen zu einer vollständigen Inhibierung der Blütenbildung bei diesen Pflanzen führt (Fig. 5).

Des weiteren wurde gefunden, daß eine Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen zu stark verringerten Lagerungsverlusten bei der Lagerung von Kartoffelknollen sowie einer Veränderung des Keimungsverhaltens der Knollen führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, beide dadurch gekennzeichnet, daß die Expression endogener Citrat-Synthasegene gehemmt wird.

Besonders bevorzugt sind in beiden Fällen Verfahren, in denen die Inhibierung der Blütenbildung bzw. die Verbesserung der Speicherkapazität dadurch erreicht wird, daß die Expression endogener Citrat-Synthasegene durch den Einsatz von anti-sense-DNA gehemmt wird.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bilden die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren resultierenden Pflanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie eine veränderte Citrat-Synthase-Aktivität aufweisen.

Des Weiteren sind Gegenstand der Erfindung DNA-Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, die für eine Citrat-Synthase kodieren, sowie Plasmide und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die für Citrat-Synthase kodieren, für die Inhibierung der Blütenbildung, sowie die Verwendung der besagten DNA-Sequenzen aus *Solanum tuberosum* in Kombination mit Steuerelementen zur Expression in pro- und eukaryontischen Zellen und die Verwendung dieser DNA-Sequenzen zur Isolierung ähnlicher Sequenzen aus dem Genom von Pflanzen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung genetisch veränderter Pflanzen, deren Aktivität der

Citrat-Synthase reduziert ist, dadurch gekennzeichnet, daß eine Expressionskassette mit folgenden Bestandteilen in das Genom der Pflanzen integriert und exprimiert wird:

- a) einem in Pflanzen funktionalen Promotor
- b) einer für Citrat-Synthase kodierenden DNA-Sequenz, die in anti-sense Orientierung an den Promotor fusioniert ist, so daß der nicht-kodierende Strang abgelesen wird
- c) einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls.

Die vorliegende Erfindung stellt ein DNA-Molekül, das eine derartige Expressionskassette enthält, in Form des Plasmids pKS-CSa zur Verfügung, dessen Zusammensetzung in Ausführungsbeispiel 3 beschrieben ist.

Als Promotor kann im Prinzip jeder in Pflanzen aktive Promotor verwendet werden. Der Promotor soll sicherstellen, daß das gewählte Gen in der Pflanze exprimiert wird. Der Promotor kann dabei so gewählt werden, daß die Expression nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt erfolgt. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die Pflanze sein.

Der Einsatz gewebespezifischer Promotoren stellt einen bevorzugten Gegenstand der Erfindung dar.

Die vorliegende Erfindung stellt DNA-Sequenzen zur Verfügung, durch deren Verwendung Veränderungen der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen tatsächlich und nachweisbar möglich sind.

Es handelt sich dabei um Sequenzen mit der kodierenden Region von Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum*.

Die in dem oben angegebenen Verfahren unter b) genannte kodierende Sequenz für Citrat-Synthase ist vorzugsweise die Sequenz aus *Solanum tuberosum* mit folgender Nukleotidabfolge :

Citrat-Synthase-Sequenz (Seq. ID No.1):

| | |
|--|-----|
| TT TTCGTTCCA TCAGCCTACT | 22 |
| | |
| TGAGATGTAT TCCCCACTGGT AAAAGTTAAT TTTTTTGATT TTTCGCGAGCA | 72 |
| | |
| ATG GTG TTC TAC CGT AGC GTT TCG TTG CTG TCA AAG CTC CGC TCT Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser | 117 |
| 1 5 10 15 | |
| | |
| CGA GCG GTC CAA CAG TCA AAT GTT AGC AAT TCT GTG CGC TGG CTT Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu | 162 |
| 20 25 30 | |
| | |
| CAA GTC CAA ACC TCT TCC GGT CTT GAT CTG CGT TCT GAG CTG GTA Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val | 207 |
| 35 40 45 | |
| | |
| CAA GAA TTG ATT CCT GAA CAA CAG GAT CGC CTG AAA AAG ATC AAG Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys | 252 |
| 50 55 60 | |
| | |
| TCA GAT ATG AAA GGT TCA ATT GGG AAC ATC ACA GTT GAT ATG GTT Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val | 297 |
| 65 70 75 | |
| | |
| CTT GGT GGA ATG AGA GGA ATG ACA GGA TTA CTG TGG AAA CCT CAT Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His | 342 |
| 80 85 90 | |
| | |
| TAC CTT GAC CCT GAT GAG GGA ATT CGC TTC CGG GGG TTG TCT ATA Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile | 387 |
| 95 100 105 | |
| | |
| CCT GAA TGC CAA AAG GTA TTA CCT GCA GCA AAG CCT GGG GGT GAG Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu | 432 |
| 110 115 120 | |

| | | |
|---|-----|-----|
| CCC TTG CCT GAA GGT CTT CTC TGG CTT CTT TTA ACA GGA AAG GTG | | 477 |
| Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Leu Thr Gly Lys Val | | |
| 125 | 130 | 135 |
| CCA TCA AAA GAG CAA GTG AAT TCA ATT GTC TCA GGA ATT GCA GAG | | 522 |
| Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu | | |
| 140 | 145 | 150 |
| TCG GGC ATC ATA TCC CTG ATC ATC ATG TAT ACA ACT ATT GAT GCC | | 567 |
| Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala | | |
| 155 | 160 | 165 |
| TTA CCA GTC ACA GCT CAT CCA ATG ACC CAG TTT GCT ACT GGA GTC | | 612 |
| Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val | | |
| 170 | 175 | 180 |
| ATG GCT CTT CAG GTT CAA AGT GAA TTT CAA AAG GCA TAC GAG AAA | | 657 |
| Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys | | |
| 185 | 190 | 195 |
| GGG ATT CAC AAA TCA AAG TAT TGG GAA CCA ACA TAT GAG GAT TCC | | 702 |
| Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser | | |
| 200 | 205 | 210 |
| ATG AAT CTG ATT GCT CAA GTT CCA CTT GTT GCT GCT TAT GTT TAT | | 747 |
| Met Asn Leu Ile Ala Gln Val Pro Leu Val Ala Ala Tyr Val Tyr | | |
| - 215 | 220 | 225 |
| CGC AGG ATG TAC AAG AAT GGT GAC ACT ATA CCT AAG GAT GAA TCC | | 792 |
| Arg Arg Met Tyr Lys Asn Gly Asp Thr Ile Pro Lys Asp Glu Ser | | |
| 230 | 235 | 240 |
| CTG GAT TAT GGT GCA AAT TTT GCT CAC ATG CTT GGT TTC AGT AGC | | 837 |
| Leu Asp Tyr Gly Ala Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Ser Ser | | |
| 245 | 250 | 255 |

| | | |
|---|-----|------|
| TCT GAA ATG CAT GAA CTT CTT ATG AGG CTC TAT GTA ACA ATA CAC | | 882 |
| Ser Glu Met His Glu Leu Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His | | |
| 260 | 265 | 270 |
| AGT GAT CAT GAA GGT GGT AAT GTC AGT GCT CAC ACC GGT CAC TTG | | 927 |
| Ser Asp His Glu Gly Gly Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu | | |
| 275 | 280 | 285 |
| GTT GCT AGT GCT TTG TCT GAT CCT TAC CTC TCC TTT GCT GCT GCT | | 972 |
| Val Ala Ser Ala Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala | | |
| — 290 | 295 | 300 |
| TTG AAT GGT TTA GCC GGA CCA CTT CAT GGT TTA GCC AAT CAG GAA | | 1017 |
| Leu Asn Gly Leu Ala Gly Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu | | |
| 305 | 310 | 315 |
| GTT TTG CTA TGG ATA AAA TCT GTT GTA GAA GAA TGT GGG GAG AAC | | 1062 |
| Val Leu Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn | | |
| 320 | 325 | 330 |
| ATT TCC AAA GAG CAG TTG AAA GAC TAT GTT TGG AAA ACA TTG AAC | | 1107 |
| Ile Ser Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Val Trp Lys Thr Leu Asn | | |
| 335 | 340 | 345 |
| AGT GGC AAG GTT GTC CCT GGT TTT GGA CAT GGA GTT CTG CGA AAG | | 1152 |
| Ser Gly Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys | | |
| — 350 | 355 | 360 |
| ACT GTA CCA AGA TAT ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT ATG AAG CAT | | 1197 |
| Thr Val Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Met Lys His | | |
| 365 | 370 | 375 |
| TTG CCT GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT TCA AAA CTC TAC GAA | | 1242 |
| Leu Pro Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu | | |
| 380 | 385 | 390 |

GTT TTC CTC CTG TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAA CCT TGG 1287
 Val Phe Leu Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Lys Pro Trp
 395 400 405

CCA AAT GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT 1332
 Pro Asn Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly
 410 415 420

TTA ACT GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGC GTA TCA AGA 1377
 Leu Thr Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg
 425 430 435

GCT CTT GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA 1422
 Ala Leu Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly
 440 445 450

TTG CCG CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG 1467
 Leu Pro Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu
 455 460 465

AAC CAG TGC AAG AAA GCA TGAATTGTTT GAAATCTCGC GAGCATAAAA 1515
 Asn Gln Cys Lys Lys Ala
 470

CACAATGTAT AATCTCTATG AATAATTGCT TGACAAAGCA CTCCTTTCTT 1565

GGGGGACAAG ATAGGTCGGC CCTTCAATGG GTTAACGAAC TTCAGTTCAA 1615
 -

ACTTCACTGA ATTTGTGTGA ATTGTATGGT TTCTCGAGAC TTGTCCTGAA 1665

TTTTGAACCTT AGTCTAGTGG ATTCAATTCTT CTTCATTCCG AATTCCCTCAC 1715

ACGCTGATCC AGCATGTAAA AATTAATAGG TCAATGCTAT TAATCGCGTT 1765

CTTGGTTGCC ATTAGACTTG TGAATGACTT CCTTGCTGG AAAGTTAGTA 1815

ATCGGCTGAT TCACGCAATA AACTGCAATT GTGTAGTTTC TTAAATTTGC 1865

TAATTCTTAT TTGATGATAT TATGAA 1891

Die anti-sense Orientierung der in b) genannten kodierenden DNA-Sequenz in bezug auf den Promotor bewirkt, daß in den transformierten Zellen eine nicht-translatierbare mRNA gebildet wird, die die Synthese einer endogenen Citrat-Synthase verhindert. Anstatt der gesamten unter Seq ID No. 1 angegebenen erfindungsgemäßen DNA-Sequenz können auch Teilsequenzen davon für die anti-sense-Inhibition verwendet werden. Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente anti-sense Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65% sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus die Verwendung von Sequenzen, die sich aus der unter Seq ID No. 1 dargestellten Sequenz durch Insertion, Deletion oder Substitution ergeben, ohne daß dadurch die inhibierende Wirkung der anti-sense-Sequenz aufgehoben wird.

Bei den für die Konstruktion von anti-sense Konstrukten verwendeten DNA-Fragmente kann es sich auch um synthetische DNA-Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen DNA-Synthesetechniken hergestellt wurden.

Eine Reduktion der Citrat-Synthaseaktivität in Pflanzenzellen kann ebenfalls erreicht werden durch die Einführung einer DNA-Sequenz, die für ein Ribozym kodiert, das spezifisch Transkripte von endogenen Citrat-Synthase-Genen endonukleolytisch spaltet. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die in der Lage sind, RNA-Moleküle an spezifischen Zielsequenzen zu spalten. Mit

Hilfe gentechnologischer Methoden ist es möglich, die Spezifität von Ribozymen zu verändern. Es existieren verschiedene Klassen von Ribozymen. Für die praktische Anwendung mit dem Ziel, das Transkript eines bestimmten Gens gezielt zu spalten, werden bevorzugt Vertreter zweier verschiedener Gruppen von Ribozymen verwendet. Die eine Gruppe wird gebildet von Ribozymen die dem Typ der Gruppe-I-Intron-Ribozymen zuzuordnen sind. Die zweite Gruppe wird von Ribozymen gebildet, die als charakteristisches Strukturmerkmal ein sogenanntes "hammerhead"-Motiv aufweisen. Die spezifische Erkennung des Ziel-RNA-Moleküls kann modifiziert werden durch Änderung der Sequenzen, die dieses Motiv flankieren. Diese Sequenzen bestimmen über Basenpaarung mit Sequenzen im Zielmolekül die Stelle, an der die katalytische Reaktion und somit die Spaltung des Zielmolekuls erfolgt. Da die Sequenzanforderungen für eine effiziente Spaltung äußerst gering sind, erscheint es daher im Prinzip möglich, spezifische Ribozyme für praktisch jedes beliebige RNA-Molekül zu entwickeln.

Die Herstellung genetisch veränderter Kartoffelpflanzen, deren Aktivität der Citrat-Synthase drastisch reduziert ist, kann daher auch erfolgen durch Einführung und Expression eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküs in Pflanzen, das sich zusammensetzt aus:

- a) einem in Pflanzen funktionalen Promotor
- b) einer DNA-Sequenz, die für eine katalytische Domäne eines Ribozyms kodiert und die flankiert ist von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu Sequenzen des Zielmoleküs, und
- c) einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküs.

Für die unter Punkt b) genannte Sequenz kommt z.B. die katalytische Domäne der Satelliten-DNA des SCMo-Virus (Davies et al., 1990, Virology, 177:216-224) oder die der Satelliten-DNA des TobR-Virus (Steinecke et al., 1992, EMBO J., 11:1525-1530; Haseloff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591) in Betracht.

Die DNA-Sequenzen, die die katalytische Domäne flankieren, werden gebildet von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu den Sequenzen endogener Citrat-Synthase-Gene.

Für die unter a) und c) genannten Sequenzen gilt dasselbe, das schon oben für die Konstruktion von anti-sense-Konstrukten angeführt wurde.

Es wurde gefunden, daß es nach der Einführung der auf dem Plasmid pKS-CSa lokalisierten DNA in das Genom einer Kartoffelpflanze neben der Inhibierung der Blütenbildung zu einer verstärkten Synthese von Stärke in den Kartoffelknollen kommt.

Durch die Kultivierung derartig veränderter Pflanzen ist es möglich, auf die Verwendung synthetischer Wachstumsregulatoren zu verzichten und somit Kosten zu senken und Risiken für die Umwelt zu vermeiden.

Die gezielte Inhibierung der Blütenbildung über die Reduktion der Citrat-Synthaseaktivität ist daher nicht nur für die Kartoffel von Interesse, sondern sollte von breiterer Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und die Landwirtschaft sein. Genannt sei z.B. die Möglichkeit, durch Kombination der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit exogen regulierbaren Steuerelementen eine zeitlich determinierte Blühinduktion oder -inhibierung zu erreichen. Dies kann für die Vermeidung von Frostschäden eine Rolle spielen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl auf dikotyle Pflanzen als auch auf monokotyle Pflanzen angewendet werden. Pflanzen, denen dabei besonderes Interesse gilt, sind Nutzpflanzen, wie Getreidearten (z.B. Roggen, Weizen, Hafer, Gerste etc.), Obstarten (z.B. Aprikose, Pfirsich, Apfel, Pflaume etc.), Gemüsearten (z.B. Tomaten, Broccoli, Spargel etc.), Zierpflanzen oder andere wirtschaftlich interessante Pflanzenarten (z.B. Tabak, Raps, Sojabohne, Sonnenblume etc.).

Von besonderem Interesse ist die Anwendung der vorliegenden Erfindung bei der Zuckerrübe. Ein wesentliches Problem beim Zuckerrübenanbau betrifft das Auftreten von "Schossen" bereits im ersten Jahr. Neben der damit einhergehenden Ertragseinbuße führt diese Schossung zur Bildung von Blüten und damit von Samen, die in der Fruchtwechselfolge stark störende Effekte aufweisen. Da die

Schossung durch niedrige Temperaturen induziert wird, wird gegenwärtig das Saatgut relativ spät ausgesetzt (im April/Mai), um eine Schossung zu vermeiden. Die Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität führt, wie hier gezeigt, in transgenen Kartoffeln zur Inhibierung der Blütenbildung. Aufgrund dieser Beobachtung ist es offensichtlich, daß eine Inhibierung der Citrat-Synthase in Zuckerrüben zu einer Reduktion der Schossung führt. Dieses erlaubt, den Zuckerrübenschoten früher auszulegen, was dann aufgrund der verlängerten Vegetationsperiode zu einem erhöhten Ertrag führt.

Die Speicherorgane der Kartoffel enthalten als Speicherstoff im wesentlichen Stärke. Die Metabolisierung der Stärke durch Respiration liefert die Energie, die beim Auskeimen der Knolle benötigt wird. Im Falle der Saatkartoffeln ist das jahreszeitlich frühe Auskeimen der Knollen von Interesse; bei Kartoffelknollen, die zu Speisezwecken verwendet werden, ist die Bildung von Sprossen jedoch nachteilig. Einerseits steigt im Verlauf der Auskeimung die Respiration stark an, was in erster Linie auf eine Metabolisierung des Hauptspeicherstoffes Stärke zurückzuführen ist, andererseits verändert sich auch die Konsistenz der Knolle, die an Festigkeit verliert und im Geschmack nachläßt. Um das Auskeimen während der Lagerung oder des Transports zu verhindern, müssen diese trocken und kühl gehalten werden, da Temperaturen über 8°C und Feuchtigkeit als Indikatoren des Beginns der Vegetationsphase Signale für die Sproßbildung sind. Diese Art der Lagerung ist zum einen sehr kostenintensiv, da sie spezielle klimatisierte Räume erfordert, und zum anderen hat sie auch negative Konsequenzen für die stoffliche Zusammensetzung der Knolle: niedrige Temperaturen führen bei Kartoffelknollen zu einer Umwandlung von Stärke in wasserlösliche Zucker. Dieser als *cold sweetening* bezeichnete Effekt wird als eine Adaptation an Standorte mit Temperaturen unter dem Gefrierpunkt diskutiert, da wäßrige Lösungen mit steigender Konzentration an gelösten Stoffen eine zunehmende Gefrierpunktserniedrigung aufweisen. Der Abbau von Stärke in den Knollen zu reduzierenden Zuckern führt zu einer Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe und senkt insofern die Temperatur, bei der es zur Bildung von Eiskristallen in den Zellen kommt. Die Qualität der Kartoffelknolle als Nahrungsmittel wird jedoch durch das *cold sweetening* erheblich herabgesetzt, da die

gesteigerte Konzentration an reduzierenden Zuckern die Konsistenz der Knollen verändert, beispielsweise kommt es beim Fritieren zu einer unerwünschten Braunfärbung des Gewebes infolge einer Maillard-Reaktion.

Überraschend wurde gefunden, daß nach Einführung der auf dem Plasmid pKS-CSa lokalisierten DNA in das Genom einer Kartoffelpflanze die Metabolisierung der Stärke in den Speichergeweben inhibiert und dadurch das Auskeimen der Kartoffelknollen unterbunden wird. Dies führt zu einer verbesserten Lagerungsfähigkeit der Knollen, so daß diese für lange Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden können.

Bereits vor dem Auskeimen findet auch in der ruhenden Kartoffelknolle eine Metabolisierung des Speicherstoffes Stärke statt. Diese ist zwar im Vergleich zu der während der Keimung stattfindenden Metabolisierung relativ gering, kann aber dennoch zu erheblichen Verlusten an Stärke bei langer Lagerung der Kartoffelknollen führen.

Durch Inhibierung der Respiration in den Kollen, können diese Lagerungsverluste verringert werden.

Durch Modifikation der in Ausführungsbeispiel 3 beschriebenen Durchführung kann auch eine Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den Geweben einer transformierten Pflanze erreicht werden. Hierzu wird eine für Citrat-Synthase kodierende DNA-Sequenz in *sense* Orientierung an einen Promotor fusioniert, d.h. das 3'-Ende des Promotors wird mit dem 5'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz verknüpft. Dies führt zur Expression einer für Citrat-Synthase kodierenden mRNA und folglich zu einer verstärkten Synthese dieses Enzyms. Die Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen führt zu verstärkter Blüten- und damit Fruchtbildung. Ein derartiger Effekt ist wünschenswert bei Kulturpflanzen wie z.B. Tomate, Paprika, oder Baumwolle und bei verschiedenen Zierpflanzen.

Durch Kombination der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit exogen regulierbaren Steuerelementen, z.B. temperaturinduzierten Promotoren, besteht auch die Möglichkeit der zeitlich determinierten Blühinduktion oder Blühinhibition, je nachdem ob

die DNA-Sequenz in *sense-* oder *antisense*-Orientierung an den Promotor fusioniert ist.

So sind unter anderem Promotoren für eine spezifische Expression in Blütenanlagen (Huijser et al. (1992) EMBO J. 11:1239-1249) oder in photosynthetisch aktiven Geweben bekannt.

Zur Verhinderung des Auskeimens von Kartoffelknollen, sowie der Lagerverluste durch Metabolisierung der Stärke sind solche Promotoren sinnvoll, die eine Aktivierung der Transkription in den Speicherorganen sicherstellen. Durch Kombination mit exogen regulierbaren Steuerelementen, beispielsweise wundinduzierbaren oder temperaturregulierten Promotoren, kann auch das Problem der vegetativen Vermehrung bei Kartoffelpflanzen, deren Knollen bei Inhibierung der Citrat-Synthase nicht auskeimen, gelöst werden. Bei der Zuckerrübe kann in analoger Weise durch Verwendung eines rübenspezifischen Promotors die Respiration reduziert und dadurch ein Ertragsverlust durch Zuckerabbau in den Rüben verhindert werden.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenzen können auch in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Insertion, Deletion oder Rekombination von DNA-Sequenzen in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen erlauben.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können ferner dazu genutzt werden, um nach Standardverfahren aus dem Genom von Pflanzen verschiedener Spezies ähnliche Sequenzen zu isolieren, die ebenfalls für eine Citrat-Synthase kodieren. Mit diesen Sequenzen können wiederum Konstruktionen zur Transformation von Pflanzen oder Mikroorganismen hergestellt werden.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten

Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie

enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. (1985) EMBO J. 4: 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) Plant Cell

Reports 5:81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden Hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Hinterlegung

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapest Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt.

Am 28.12.1993 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) folgende Plasmide hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pPCS (DSM 8879)

Plasmid pKS-CSa (DSM 8880)

Verwendete Abkürzungen

| | |
|---------------------|---|
| BSA | Rinderserumalbumin |
| EDTA | (Ethylendinitriolo)tetraessigsäure |
| 50x Denhardt-Lösung | 5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia) 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g Rinderserumalbumin (Fraktion V, Sigma) ad 500 ml mit H ₂ O |
| FADH ₂ | Flavin-Adenin-Dinucleotid, reduziert |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |

| | |
|------------|--|
| NADH | β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| SCMo-Virus | "subterranean clover mottle virus" |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| 20x SSC | 175.3 g NaCl, 88.2 g Natriumcitrat ad 1000 ml mit H ₂ O, pH 7.0 mit 10 N NaOH |
| TobR-Virus | "tobacco ringspot virus" |
| Trizin | N-Tris(hydroxymethyl)-Methylglycin |

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt das Plasmid pPCS

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBlueskript KS. Die starke Linie repräsentiert die cDNA-Insertion.

Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 2 zeigt das Plasmid pKS-CSa

Aufbau des Plasmids:

A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437
(Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

B = Fragment B: Citrat-Synthase-cDNA aus Kartoffel,
BamHI/SalI-Fragment, ca. 1900 bp
Orientierung: anti-sense

C= Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids
pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846)

Fig. 3 zeigt das Ergebnis eines Northern-Blot Experiments

Zur Analyse wurden jeweils 2 μ g poly(A⁺)-mRNA aus verschiedenen transgenen Kartoffelpflanzen (Spur 4-8) und drei nicht-transformierten Kartoffelpflanzen (Spur 1-3) verwendet.

Spuren 1, 2, und 3 : Wildtyp *Solanum tuberosum* cv. Désirée

Spur 4: transgene Kartoffellinie T6

Spur 5: transgene Kartoffellinie T21

- Spur 6: transgene Kartoffellinie T29
Spur 7: transgene Kartoffellinie T50
Spur 8: transgene Kartoffellinie T55

Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte cDNA der Citrat-Synthase aus Kartoffeln verwendet.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität aus Blättern, Knollen und Mitochondrien aus Knollen von Wildtyp-Pflanzen im Vergleich mit Pflanzen der transgenen Kartoffellinien T6, T29, T50 und T55

Fig. 5 zeigt transgene Kartoffelpflanzen der Linien T6 (Nr. 3 und 4) und T29 (Nr. 5 und 6) im Vergleich mit Wildtyp-Pflanzen (Nr. 1 und 2). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit, 10°C bis 15°C unter einem 14h/10h (Licht/Dunkel) Lichtrhythmus kultiviert.

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden die wichtigsten eingesetzten Verfahren im folgenden erläutert.

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in E.coli wurde der Vektor pBlueskriptKS (Stratagene) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR kloniert.

2. Bakterienstämme

Für den pBlueskriptKS-Vektor und für die pBinAR-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die *in vivo excision* wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 durchgeführt (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J. 8:23-29).

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16:9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Pflanzentransformation

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige&Skoog (1962) Physiol. Plant. 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1.6% Glukose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0.2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0.80.% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1.6% Glukose, 1.4 mg/l Zeatinribose, 20 µg/l Naphthylessigsäure, 20 µg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0.80.% Bacto Agar gelegt.

5. Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität in Geweben transgener Kartoffelpflanzen und nicht-transformierter Kartoffelpflanzen

Für die Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität wurden Rohextrakte aus Knollen, Blättern und Blüten hergestellt sowie Mitochondrien aus Kartoffelknollen isoliert. Für die Herstellung von Rohextrakten wurde das jeweilige Material in flüssigem Stickstoff gefroren, in Extraktionspuffer (Neuhaus und Stitt (1990) Planta 182:445-454) homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand anschließend für den Aktivitätstest verwendet. Für die Isolierung von Mitochondrien aus Kartoffelknollen wurden 100-200 g frisch geerntete Knollen geschält und in 100 ml "Grinding buffer" (0.4 M Mannitol, 1 mM EDTA, 25 mM MOPS, 0.1% BSA, 10 mM β-

Mercaptoethanol, 0.05 mM PMSF, pH 7.8) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Baumwoll-Gaze filtriert und für 4 min bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 2 Lagen "Miracloth" (Calbiochem) gefiltert und nochmals für 30 min bei 18000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer weichen Bürste in 2 ml Resuspensionspuffer (0.4 M Mannitol, 20 mM Trizin, 2 mM EDTA, pH 7.2) resuspendiert. Nach zweifacher Homogenisierung in einem "Potter"-Homogenisator wurde der Extrakt auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradient geschichtet und 1 h bei 72000 g zentrifugiert. Mitochondrien wurden aus der 28%/45%-Interphase entnommen, gewaschen und zweimal für 15 min bei 14500 g in "Washing buffer" (0.4 M Mannitol, 5 mM MOPS, 0.1% BSA, 0.2 mM PMSF, pH 7.5) zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden anschließend in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Für die Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität wurden 5 µl der Mitochondriensuspension in 100 µl Extraktionspuffer (Neuhaus und Stitt (1990) Planta 182:445-454) aufgenommen. Die Citrat-Synthaseaktivität wurde spektralphotometrisch bei 412 nm und 30°C nach der Methode von Srere (1967, Methods in Enzymology 13:3-22) bestimmt.

6. RNA-Extraktion und Northern Blot-Experimente

RNA wurde aus gefrorenem Pflanzenmaterial isoliert wie beschrieben in Logemann et al. (1987, Anal. Biochem. 163:21-26). Die RNA wurde denaturiert in 40% Formamid. Anschließend wurde die RNA geelektrophoretisch auf Formaldehyd/Agarosegelen aufgetrennt und nach dem Gellauf auf Nylonmembran (Hybond N; Amersham, UK) geblottet. Die Hybridisierung gegen eine radioaktiv markierte DNA-Probe erfolgte nach Standardmethoden.

7. Pflanzenhaltung

Solanum tuberosum-Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit, 10 bis 15°C und einem 14h/10h (Licht/Dunkel) Lichtrhythmus gehalten.

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1

Klonierung einer cDNA der Citrat-Synthase aus Kartoffel

Für die Identifizierung einer cDNA aus Kartoffel, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde zunächst ein DNA-Fragment der bereits bekannten cDNA von Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:411-418) amplifiziert. Hierfür wurde aus grünem Pflanzengewebe von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen Gesamt-RNA extrahiert und aus dieser poly(A⁺)-mRNA präpariert. Diese wurde anschließend für die Herstellung von cDNA verwendet. Aus dieser cDNA-Präparation wurde mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide

5'-AAGTGGATCCATGGTGTTCGCAGCGTAT-3' und
5'-CATAGGATCCTTAAGCAGATGAAGCTTCTTA-3',

die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der kodierenden Region der cDNA der Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13: 411-418) sind, durch eine "Polymerase Chain Reaction" (PCR) ein 1438 bp langes DNA-Fragment isoliert, das für die Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* kodiert. Die verwendeten Oligonukleotide führen zusätzlich an beiden Enden des amplifizierten DNA-Fragments BamHI-Schnittstellen ein. Das aus der PCR-Reaktion resultierende DNA-Fragment wurde mit BamHI verdaut und in das mit BamHI geschnittene Plasmid pUC9.2 ligiert. Die cDNA-Insertion dieses Plasmids wurde später als heterologe Probe für die Identifizierung einer für Citrat-Synthase kodierenden cDNA aus Kartoffel verwendet.

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurde aus Blättern von Kartoffelpflanzen poly(A⁺)-mRNA isoliert. Ausgehend von der poly(A⁺)-mRNA wurde cDNA hergestellt, die mit EcoRI/NotI-linkern versehen wurde, und mit der eine cDNA-Bibliothek in dem Vektor Lambda ZAP II (Stratagene) angelegt wurde (Koßmann et al. (1992) Planta 188:7-12). 250000 Plaques dieser cDNA-Bibliothek wurden mit Hilfe der heterologen Probe aus *Arabidopsis thaliana* auf DNA-Sequenzen hin untersucht, die homolog zu dieser sind. Dazu wurden die Plaques auf Nitrozellulose-Filter übertragen und durch NaOH-Behandlung denaturiert. Die Filter wurden anschließend neutralisiert, und die DNA auf den Filtern durch Hitzebehandlung fixiert. Die Filter wurden in 25% Formamid, 0.5% BSA, 1% SDS, 5xSSC, 5x Denhardt-Lösung, 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.2 und

100 µg/ml Lachssperma-DNA prähybridisiert für 2 Stunden bei 42°C. Anschließend wurden die Filter in 25% Formamid, 0.5% BSA, 1% SDS, 5xSSC, 5x Denhardt-Lösung, 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.2 und 100 µg/ml Lachssperma-DNA nach Zugabe der P³²-markierten, für Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* kodierenden cDNA über Nacht bei 42°C hybridisiert. Die Filter wurden für 30 min in 5xSSC, 0.5% SDS bei 42°C und für 20 min in 3xSSC, 0.5% SDS bei 42°C gewaschen.

Phagenklone der cDNA-Bibliothek, die mit der verwendeten cDNA aus *Arabidopsis thaliana* hybridisierten, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen E.coli-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBlueskript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion in der EcoRI-Schnittstelle des polylinkers enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

Ausführungsbeispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pPCS

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 1 erhaltenen E.coli-Klon wurde das Plasmid pPCS (Fig. 1) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 1891 bp lang. Die Nukleotidsequenz (Seq. ID No. 1) ist oben angegeben.

Ausführungsbeispiel 3

Konstruktion des Plasmids pKS-CSa und Einführung des Plasmids in das pflanzliche Genom

Aus dem Plasmid pPCS wurde durch BamHI/SalI-Verdau ein ca. 1.9 kb langes DNA-Fragment isoliert, das die oben angegebene Sequenz (Seq. ID No. 1) aufweist und die kodierende Region für Citrat-

Synthase aus Kartoffeln enthält. Dieses DNA-Fragment wurde in den mit BamHI/SalI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) kloniert. Der Vektor pBinAR ist ein Derivat des binären Vektors Bin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res. 12:8711-8721).

Das resultierende Plasmid wurde pKS-CSa genannt und ist in Fig. 2 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 2) :

Das Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

Das Fragment B umfaßt die proteinkodierende Region der Citrat-Synthase aus Kartoffeln. Diese wurde wie oben beschrieben als BamHI/SalI-Fragment aus pPCS isoliert und in *anti-sense* Orientierung an den Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (192 bp) beinhaltet das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846).

Die Größe des Plasmids pKS-CSa beträgt ca. 12.9 kb.

Der Vektor pKS-CSa wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation in Kartoffeln transferiert. Intakte Pflanzen wurden aus den transformierten Zellen regeneriert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen in verschiedenem Ausmaß eine Verringerung der für die Citrat-Synthase kodierenden mRNA (siehe Fig. 3). Es wurden 2 µg poly(A⁺)-mRNA in einem Northern-Blot Experiment mit der Sonde für Citrat-Synthase aus Kartoffeln hybridisiert. Das in Wildtyp-Pflanzen auftretende, für Citrat-Synthase kodierende Transkript (Spuren 1 bis 3) ist kürzer als das Transkript der anti-sense-Expressionskassette (siehe beispielsweise Spur 6), wodurch sich

erkennen läßt, daß es in den verschiedenen transgenen Pflanzen zu einer unterschiedlich starken Reduktion der endogenen Transkripte gekommen ist.

Transgene Kartoffelpflanzen, die eine Verringerung der für die Citrat-Synthase kodierenden mRNA aufwiesen, wurden im Hinblick auf die Citrat-Synthaseaktivität in verschiedenen Geweben untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Blättern, Knollen und aus Knollen isolierten Mitochondrien sind in Fig. 4 dargestellt.

Die Verringerung der Citrat-Synthaseaktivität hat in den transgenen Pflanzen einen erheblichen Effekt auf die Blütenbildung, dessen Ausprägung vom Ausmaß der Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität abhängt.

Transformierte Kartoffelpflanzen, bei denen die Citrat-Synthaseaktivität stark verringert ist (vergleiche Fig. 4), sind in ihrer Blütenbildung stark bis vollkommen inhibiert (siehe Fig. 5).

Pflanzen bei denen die Citrat-Synthaseaktivität nur mäßig verringert ist, zeigen eine verspätete Blütenbildung und setzen weniger Blüten an oder bilden nur Blütenknospen, die sich nicht zu funktionsfähigen Blüten weiterentwickeln.

SEQ ID NO.:

1

ART DER SEQUENZ:

Nukleotid mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE:

1891 Basenpaare

STRANGFORM:

Einzelstrang

TOPOLOGIE:

linear

ART DES MOLEKÜLS:

cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS:

Solanum tuberosum

HERKUNFT:

cDNA-Bibliothek im Plasmid pBlueskriptKS

MERKMALE:

von Nukleotid 73-1485 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN:

Citrat-Synthase

| | | | | | |
|---|---|------------|-----------|------------|----|
| | TT TTTCGTTCCA | TCAGCCTACT | 22 | | |
| TGAGATGTAT | TCCCCACTGGT | AAAAGTTAAT | TTTTTGATT | TTCGCGAGCA | 72 |
| ATG GTG TTC TAC CGT AGC GTT TCG TTG CTG TCA AAG CTC CGC TCT | Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser | 10 | 15 | 117 | |
| 1 | 5 | | | | |
| CGA GCG GTC CAA CAG TCA AAT GTT AGC AAT TCT GTG CGC TGG CTT | Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu | 20 | 25 | 162 | |
| 20 | 25 | | | 30 | |
| CAA GTC CAA ACC TCT TCC GGT CTT GAT CTG CGT TCT GAG CTG GTA | Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val | 35 | 40 | 207 | |
| 35 | 40 | | | 45 | |
| CAA GAA TTG ATT CCT GAA CAA CAG GAT CGC CTG AAA AAG ATC AAG | Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys | 50 | 55 | 252 | |
| 50 | 55 | | | 60 | |
| TCA GAT ATG AAA GGT TCA ATT GGG AAC ATC ACA GTT GAT ATG GTT | Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val | 65 | 70 | 297 | |
| 65 | 70 | | | 75 | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| CTT GGT GGA ATG AGA GGA ATG ACA GGA TTA CTG TGG AAA CCT CAT | | | 342 |
| Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His | | | |
| 80 | 85 | 90 | |
| TAC CTT GAC CCT GAT GAG GGA ATT CGC TTC CGG GGG TTG TCT ATA | | | 387 |
| Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile | | | |
| 95 | 100 | 105 | |
| CCT GAA TGC CAA AAG GTA TTA CCT GCA GCA AAG CCT GGG GGT GAG | | | 432 |
| Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu | | | |
| 110 | 115 | 120 | |
| CCC TTG CCT GAA GGT CTT CTC TGG CTT CTT TTA ACA GGA AAG GTG | | | 477 |
| Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Leu Thr Gly Lys Val | | | |
| 125 | 130 | 135 | |
| CCA TCA AAA GAG CAA GTG AAT TCA ATT GTC TCA GGA ATT GCA GAG | | | 522 |
| Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu | | | |
| 140 | 145 | 150 | |
| TCG GGC ATC ATA TCC CTG ATC ATC ATG TAT ACA ACT ATT GAT GCC | | | 567 |
| Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala | | | |
| 155 | 160 | 165 | |
| TTA CCA GTC ACA GCT CAT CCA ATG ACC CAG TTT GCT ACT GGA GTC | | | 612 |
| Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val | | | |
| - 170 | 175 | 180 | |
| ATG GCT CTT CAG GTT CAA AGT GAA TTT CAA AAG GCA TAC GAG AAA | | | 657 |
| Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys | | | |
| 185 | 190 | 195 | |
| GGG ATT CAC AAA TCA AAG TAT TGG GAA CCA ACA TAT GAG GAT TCC | | | 702 |
| Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser | | | |
| 200 | 205 | 210 | |

| | | |
|---|-----|------|
| ATG AAT CTG ATT GCT CAA GTT CCA CTT GTT GCT GCT TAT GTT TAT | | 747 |
| Met Asn Leu Ile Ala Gln Val Pro Leu Val Ala Ala Tyr Val Tyr | | |
| 215 | 220 | 225 |
| CGC AGG ATG TAC AAG AAT GGT GAC ACT ATA CCT AAG GAT GAA TCC | | 792 |
| Arg Arg Met Tyr Lys Asn Gly Asp Thr Ile Pro Lys Asp Glu Ser | | |
| 230 | 235 | 240 |
| CTG GAT TAT GGT GCA AAT TTT GCT CAC ATG CTT GGT TTC AGT AGC | | 837 |
| Leu Asp Tyr Gly Ala Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Ser Ser | | |
| 245 | 250 | 255 |
| TCT GAA ATG CAT GAA CTT CTT ATG AGG CTC TAT GTA ACA ATA CAC | | 882 |
| Ser Glu Met His Glu Leu Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His | | |
| 260 | 265 | 270 |
| AGT GAT CAT GAA GGT GGT AAT GTC AGT GCT CAC ACC GGT CAC TTG | | 927 |
| Ser Asp His Glu Gly Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu | | |
| 275 | 280 | 285 |
| GTT GCT AGT GCT TTG TCT GAT CCT TAC CTC TCC TTT GCT GCT GCT | | 972 |
| Val Ala Ser Ala Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala | | |
| 290 | 295 | 300 |
| TTG AAT GGT TTA GCC GGA CCA CTT CAT GGT TTA GCC AAT CAG GAA | | 1017 |
| Leu Asn Gly Leu Ala Gly Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu | | |
| - 305 | 310 | 315 |
| GTT TTG CTA TGG ATA AAA TCT GTT GTA GAA GAA TGT GGG GAG AAC | | 1062 |
| Val Leu Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn | | |
| 320 | 325 | 330 |
| ATT TCC AAA GAG CAG TTG AAA GAC TAT GTT TGG AAA ACA TTG AAC | | 1107 |
| Ile Ser Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Val Trp Lys Thr Leu Asn | | |
| 335 | 340 | 345 |

| | | |
|---|-----|------|
| AGT GGC AAG GTT GTC CCT GGT TTT GGA CAT GGA GTT CTG CGA AAG | | 1152 |
| Ser Gly Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys | | |
| 350 | 355 | 360 |
| ACT GTA CCA AGA TAT ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT ATG AAG CAT | | 1197 |
| Thr Val Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Met Lys His | | |
| 365 | 370 | 375 |
| TTG CCT GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT TCA AAA CTC TAC GAA | | 1242 |
| Leu Pro Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu | | |
| - 380 | 385 | 390 |
| GTT TTC CTC CTG TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAA CCT TGG | | 1287 |
| Val Phe Leu Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Lys Pro Trp | | |
| 395 | 400 | 405 |
| CCA AAT GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT | | 1332 |
| Pro Asn Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly | | |
| 410 | 415 | 420 |
| TTA ACT GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGC GTA TCA AGA | | 1377 |
| Leu Thr Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg | | |
| 425 | 430 | 435 |
| GCT CTT GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA | | 1422 |
| Ala Leu Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly | | |
| - 440 | 445 | 450 |
| TTG CCG CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG | | 1467 |
| Leu Pro Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu | | |
| 455 | 460 | 465 |
| AAC CAG TGC AAG AAA GCA TGAATTGTTT GAAATCTCGC GAGCATAAAA | | 1515 |
| Asn Gln Cys Lys Lys Ala | | |
| 470 | | |
| CACAATGTAT AATCTCTATG AATAATTGCT TGACAAAGCA CTCCTTTCTT | | 1565 |

| | |
|---|------|
| GGGGGACAAG ATAGGTCGGC CCTTCAATGG GTTAACGAAC TTCAGTTCAA | 1615 |
| ACTTCACTGA ATTTGTGTGA ATTGTATGGT TTCTCGAGAC TTGTCCTGAA | 1665 |
| TTTTGAACCTT AGTCTAGTGG ATTCAATTCTT CTTCATTCCG AATTCCCTCAC | 1715 |
| ACGCTGATCC AGCATGTAAA AATTAATAAGG TCAATGCTAT TAATCGCGTT | 1765 |
| CTTGGTTGCC ATTAGACTTG TGAATGACTT CCTTGCTGG AAAGTTAGTA | 1815 |
| ATCGGCTGAT TCACGCAATA AACTGCAATT GTGTAGTTTC TTAAATTGCG | 1865 |
| TAATTCTTAT TTGATGATAT TATGAA | 1891 |

Patentansprüche

1. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Citrat-Synthase gehemmt wird.
2. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Citrat-Synthase durch den Einsatz von anti-sense-DNA gehemmt wird.
3. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
 - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
 - c) die Expression endogener Citratsynthase-Gene aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
 - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
4. Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
 - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
 - c) die Expression der Citratsynthase aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
 - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, worin die verwendete anti-sense-DNA in sense Orientierung eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der folgenden Sequenz

Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser

Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu
20 25 30

Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val
35 40 45

Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys
50 55 60

Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val
— 65 70 75

Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His
80 85 90

Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile
95 100 105

Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu
110 115 120

Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Leu Thr Gly Lys Val
125 130 135

Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu
140 145 150

—

Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala
155 160 165

Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val
170 175 180

Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys
185 190 195

Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser
200 205 210

Met Asn Leu Ile Ala Gln Val Pro Leu Val Ala Ala Tyr Val Tyr
215 220 225

Arg Arg Met Tyr Lys Asn Gly Asp Thr Ile Pro Lys Asp Glu Ser
230 235 240

Leu Asp Tyr Gly Ala Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Ser Ser
245 250 255

Ser Glu Met His Glu Leu Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His
— 260 265 270

Ser Asp His Glu Gly Gly Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu
275 280 285

Val Ala Ser Ala Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala
290 295 300

Leu Asn Gly Leu Ala Gly Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu
305 310 315

Val Leu Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn
320 325 330

Ile Ser Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Val Trp Lys Thr Leu Asn
335 340 345

—

Ser Gly Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys
350 355 360

Thr Val Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Met Lys His
365 370 375

Leu Pro Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu
380 385 390

Val Phe Leu Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Lys Pro Trp
395 400 405

| | | |
|---|-----|-----|
| Pro Asn Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly | | |
| 410 | 415 | 420 |
| Leu Thr Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg | | |
| 425 | 430 | 435 |
| Ala Leu Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly | | |
| 440 | 445 | 450 |
| Leu Pro Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu | | |
| 455 | 460 | 465 |
| Asn Gln Cys Lys Lys Ala | | |
| 470 | | |

oder eines Teiles davon kodiert, wobei die kodierende Sequenz lang genug ist, um die Expression eines endogenen Citrat-Synthasegens zu inhibieren.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, worin die DNA in sense Orientierung die folgende Nukleotidsequenz (Seq ID No. 1)

| | |
|--|-----|
| TTTTTCGTTC CATCAGCCTA CTTGAGATGT ATTCCCCTTG GTAAAAGTTA | 50 |
| ATTTTTTGA TTTTCGCGAG CAATGGTGTT CTACCGTAGC GTTTCGTTGC | 100 |
| TGTCAAAGCT CCGCTCTCGA GCGGTCCAAC AGTCAAATGT TAGCAATTCT | 150 |
| GTCGCTGGC TTCAAGTCCA AACCTCTTCC GGTCTTGATC TGCCTTCTGA | 200 |
| GCTGGTACAA GAATTGATTC CTGAACAACA GGATCGCCTG AAAAAGATCA | 250 |
| AGTCAGATAT GAAAGGTTCA ATTGGGAACA TCACAGTTGA TATGGTTCTT | 300 |
| GGTGGAATGA GAGGAATGAC AGGATTACTG TGGAAACCTC ATTACCTTGA | 350 |
| CCCTGATGAG GGAATTGCT TCCGGGGTT GTCTATACT GAATGCCAAA | 400 |
| AGGTATTACC TGCAGCAAAG CCTGGGGGTG AGCCCTTGCC TGAAGGTCTT | 450 |
| CTCTGGCTTC TTTAACAGG AAAGGTGCCA TCAAAAGAGC AAGTGAATTG | 500 |
| AATTGTCTCA GGAATTGCAG AGTCGGGCAT CATATCCCTG ATCATCATGT | 550 |
| ATACAACTAT TGATGCCTTA CCAGTCACAG CTCATCCAAT GACCCAGTTT | 600 |

| | |
|---|------|
| GCTACTGGAG TCATGGCTCT TCAGGTTCAA AGTGAATTTC AAAAGGCATA | 630 |
| CGAGAAAGGG ATTCACAAAT CAAAGTATTG GGAACCAACA TATGAGGATT | 700 |
| CCATGAATCT GATTGCTCAA GTTCCACTTG TTGCTGCTTA TGTTTATCGC | 750 |
| AGGATGTACA AGAATGGTGA CACTATACCT AAGGATGAAT CCCTGGATT | 800 |
| TGGTGCAAAT TTTGCTCACA TGCTTGGTTT CAGTAGCTCT GAAATGCATG | 850 |
| AACTTCTTAT GAGGCTCTAT GTAACAATAC ACAGTGATCA TGAAGGTGGT | 900 |
| AATGTCAGTG CTCACACCGG TCACTTGGTT GCTAGTGCTT TGTCTGATCC | 950 |
| TTACCTCTCC TTTGCTGCTG CTTTGAATGG TTTAGCCGGA CCACCTCATG | 1000 |
| GTTTAGCCAA TCAGGAAGTT TTGCTATGGA TAAAATCTGT TGTAGAAGAA | 1050 |
| TGTGGGGAGA ACATTTCCAA AGAGCAGTTG AAAGACTATG TTTGGAAAAC | 1100 |
| ATTGAACAGT GGCAAGGTTG TCCCTGGTTT TGGACATGGA GTTCTGCGAA | 1150 |
| AGACTGTACC AAGATATACA TGCCAGAGAG AGTTCGCTAT GAAGCATTG | 1200 |
| CCTGAAGATC CACTGTTCA ACTGGTTCA AAACTCTACG AAGTTTCCT | 1250 |
| CCTGTTCTTA CAGAACATTGG CAAAGTTAAA ACCTTGGCCA AATGTTGATG | 1300 |
| CCCACAGTGG TGTGTTGTTG AACTATTATG GTTTAACTGA AGCAAGATAT | 1350 |
| TATACGGTCC TCTTTGGCGT ATCAAGAGCT CTTGGCATTG GCTCTCAGCT | 1400 |
| AATTTGGGAC CGAGCTCTTG GATTGCCGCT AGAGAGGCCA AAGAGTGTCA | 1450 |
| CAATGGAGTG GCTTGAGAAC CAGTGCAAGA AAGCATGAAT TGTTGAAAT | 1500 |
| CTCGCGAGCA TAAAACACAA TGTATAATCT CTATGAATAA TTGCTTGACA | 1550 |
| AAGCACTCCT TTCTTGGGGG ACAAGATAGG TCGGCCCTTC AATGGGTTAA | 1600 |
| CGAACCTTCAG TTCAAACCTTC ACTGAATTG TGTGAATTGT ATGGTTCTC | 1650 |
| GAGACTTGTC CTGAATTTG AACTTAGTCT AGTGGATTCA TTTTCTTCA | 1700 |
| TTCCGAATTC CTCACACGCT GATCCAGCAT GTAAAAATTA ATAGGTCAAT | 1750 |
| GCTATTAATC GCGTTCTTGG TTGCCATTAG ACTTGTGAAT GACTTCCTT | 1800 |
| GCTGGAAAGT TAGTAATCGG CTGATTCACG CAATAAACTG CAATTGTGTA | 1850 |
| GTTCCTTAAA TTTGCTAATT CTTATTTGAT GATATTATGA A | 1891 |

oder einen Teil davon umfaßt oder Derivate davon, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet sind.

7. Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die homologen oder heterologen Ursprungs ist und die für ein Protein mit Citrat-Synthase-Aktivität kodiert,
- b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
- c) es aufgrund dieser Expression zu einer Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den transgenen Zellen kommt und
- d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, worin die für eine Citrat-Synthase-Aktivität kodierende DNA-Sequenz eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der folgenden Sequenz

| | | | |
|---|---|----|----|
| Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu | | | |
| 20 | 25 | 30 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys | | | |
| 50 | 55 | 60 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val | | | |
| 65 | 70 | 75 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His | | | |
| 80 | 85 | 90 | |

| | | | |
|---|-----|-----|--|
| Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile | | | |
| 95 | 100 | 105 | |

| | | | |
|---|-----|-----|--|
| Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu | | | |
| 110 | 115 | 120 | |

Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Leu Thr Gly Lys Val
125 130 135

Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu
140 145 150

Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala
155 160 165

Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val
170 175 180

Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys
185 190 195

Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser
200 205 210

Met Asn Leu Ile Ala Gln Val Pro Leu Val Ala Ala Tyr Val Tyr
215 220 225

Arg Arg Met Tyr Lys Asn Gly Asp Thr Ile Pro Lys Asp Glu Ser
230 235 240

Leu Asp Tyr Gly Ala Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Ser Ser
245 250 255

Ser Glu Met His Glu Leu Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His
260 265 270

Ser Asp His Glu Gly Gly Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu
275 280 285

Val Ala Ser Ala Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala
290 295 300

Leu Asn Gly Leu Ala Gly Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu
305 310 315

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Leu | Leu | Trp | Ile | Lys | Ser | Val | Val | Glu | Glu | Cys | Gly | Glu | Asn |
| | | | | 320 | | | | 325 | | | | | 330 | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | Ser | Lys | Glu | Gln | Leu | Lys | Asp | Tyr | Val | Trp | Lys | Thr | Leu | Asn |
| | | | | 335 | | | | 340 | | | | 345 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Gly | Lys | Val | Val | Pro | Gly | Phe | Gly | His | Gly | Val | Leu | Arg | Lys |
| | | | | 350 | | | | 355 | | | | 360 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Val | Pro | Arg | Tyr | Thr | Cys | Gln | Arg | Glu | Phe | Ala | Met | Lys | His |
| | | | | 365 | | | | 370 | | | | 375 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Pro | Glu | Asp | Pro | Leu | Phe | Gln | Leu | Val | Ser | Lys | Leu | Tyr | Glu |
| | | | | 380 | | | | 385 | | | | 390 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Phe | Leu | Leu | Phe | Leu | Gln | Asn | Leu | Ala | Lys | Leu | Lys | Pro | Trp |
| | | | | 395 | | | | 400 | | | | 405 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Asn | Val | Asp | Ala | His | Ser | Gly | Val | Leu | Leu | Asn | Tyr | Tyr | Gly |
| | | | | 410 | | | | 415 | | | | 420 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Thr | Glu | Ala | Arg | Tyr | Tyr | Thr | Val | Leu | Phe | Gly | Val | Ser | Arg |
| | | | | 425 | | | | 430 | | | | 435 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Leu | Gly | Ile | Cys | Ser | Gln | Leu | Ile | Trp | Asp | Arg | Ala | Leu | Gly |
| | | | | 440 | | | | 445 | | | | 450 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Pro | Leu | Glu | Arg | Pro | Lys | Ser | Val | Thr | Met | Glu | Trp | Leu | Glu |
| | | | | 455 | | | | 460 | | | | 465 | | |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Gln | Cys | Lys | Lys | Ala | | | | | | | | | |
| | | | | 470 | | | | | | | | | | |

kodiert.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7, in dem die für eine Citrat-Synthase-Aktivität kodierende DNA-Sequenz die folgende Nukleotidsequenz (Seq ID No. 1)

TTTTTCGTTTC CATCAGCCTA CTTGAGATGT ATTCCCACTG GTAAAAGTTA 50

| | |
|---|------|
| ATTTTTTGAGTTTCGCGAGCAATGGTGTCTACCGTAGC | 100 |
| TGTCAAAGCTCCGCTCTCGAGCGGTCCAACAGTCAAATGT | 150 |
| GTGCGCTGGCTTCAAGTCCAACCTCTTCCGGTCTTGATCTGC | 200 |
| GCTGGTACAAAGATTGATTCCTGAACAACAAGATCGCCTG | 250 |
| AGTCAGATATGAAAGGTTCAATTGGGAACATCACAGTTGA | 300 |
| GGTGGAAATGAGGAAATGACAGGATTACTGTGGAACACCTC | 350 |
| CCCTGATGAGGGAATTGCTTCCGGGGGTTGTCTATACCTGAATGCCAAA | 400 |
| AGGTATTACCTGCAGCAAAGCCTGGGGTGAGCCCTTGCC | 450 |
| CTCTGGCTTCCTTAACAGGAAGGTGCCATCAAAGAGCAAGTGAATT | 500 |
| AATTGTCTCAAGAATTGCAGAGTCGGGCATCATATCCCTGATCATCATGT | 550 |
| ATACAACATATTGATGCCTTAAGTCACAGCTCATCCAATGACCCAGTT | 600 |
| GCTACTGGAGTCATGGCTCTTCAGGTTCAAAGTGAATTCAAAAGGCATA | 650 |
| CGAGAAAGGGATTCACAAATCAAAGTATTGGAACACATATGAGGATT | 700 |
| CCATGAATCTGATTGCTCAA GTTCCACTTGTTGCTGCTTATGTTTATCGC | 750 |
| AGGATGTACAAGAATGGTACACTACCTAAGGATGAATCCCTGGATT | 800 |
| TGGTGCAAATTTGCTCACA TGCTGGTTTCAAGTAGCTCTGAAATGCATG | 850 |
| AACTTCTTATGAGGCTCTATGTAACAATACACAGTGATCA | 900 |
| AATGTCAGTCACACCCTGACTTGGTTGCTAGTGCTTGTCTGATCC | 950 |
| TTACCTCTCCTTGCTGCTGCTTGATGGTTAGCCGGA | 1000 |
| GTAGCCAACTAGGAAGTTTGCTATGGA | 1050 |
| TAAAATCTGTGTTAGGAGAAGAGCAGTTGAAAGACTATG | 1100 |
| ATTGAACAGTGGCAAGGTTGTCCTGGTTTGGACATGGA | 1150 |
| AGACTGTACCAAGATATACA | 1200 |
| TGCCAGAGAGAGTCAGCTATGAAGCATTG | 1250 |
| CCTGAAGATC CACTGTTCAACTGGTTCAAAACTCTACG | 1300 |
| AAGTTTCCCTTGTTCTTACAGAACTTGGCAAAGTAAACCTGGCCA | 1350 |
| CCCACAGTGGTGTGTTGAACTATTATG | 1400 |
| TATACGGTCCCTTTGGCGTATCAAGAGCTTGGCATTGCTCTCAGCT | 1450 |
| AATTGGGACCGAGCTCTTGATTGCCGCTAGAGAGGCCA | 1500 |
| CAATGGAGTGCTTGAGAACAGTGCAAGAAAGCATGAATTGTTGAAAT | |

| | |
|--|------|
| CTCGCGAGCA TAAAACACAA TGTATAATCT CTATGAATAA TTGCTTGACA | 1550 |
| AAGCACTCCT TTCTTGGGG ACAAGATAGG TCGGCCCTTC AATGGGTTAA | 1600 |
| CGAACCTTCAG TTCAAACCTTC ACTGAATTG TGTGAATTGT ATGGTTCTC | 1650 |
| GAGACTTGTC CTGAATTTG AACTTAGTCT AGTGGATTCA TTTTCTTCA | 1700 |
| TTCCGAATTCTCACACGCT GATCCAGCAT GTAAAAATTA ATAGGTCAAT | 1750 |
| GCTATTAATC GCGTTCTTGG TTGCCATTAG ACTTGTGAAT GACTTCCTT | 1800 |
| GCTGGAAAGT TAGTAATCGG CTGATTACAG CAATAAACTG CAATTGTGTA | 1850 |
| TTTCTTAAA TTTGCTAATT CTTATTTGAT GATATTATGA A | 1891 |

oder einen Teil davon umfaßt, wobei der Teil lang genug ist, um für ein Protein zu kodieren, das Citrat-Synthase-Aktivität aufweist.

10. DNA-Sequenzen aus einer Pflanze der Familie der Solanaceae, die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information bei Integration in ein pflanzliches Genom die Bildung von Ribonukleinsäure erlaubt und über diese Ribonukleinsäure eine endogene Citrat-Synthaseaktivität unterdrückt werden kann.

11. DNA-Sequenzen aus Pflanzen der Spezies *Solanum tuberosum*, die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information bei Integration in ein pflanzliches Genom die Bildung von Ribonukleinsäure erlaubt und über diese Ribonukleinsäure eine endogene Citrat-Synthaseaktivität unterdrückt werden kann.

12. DNA-Sequenzen aus einer Pflanze der Familie der Solanaceae, die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß durch die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information die Citratsynthaseaktivität in Pflanzenzellen erhöht werden kann.

13. DNA-Sequenzen aus Pflanzen der Spezies *Solanum tuberosum*, die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß durch die in der

Nukleotidabfolge enthaltene Information die Citratsynthaseaktivität in Pflanzenzellen erhöht werden kann.

14. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz folgende Nukleotidabfolge (Seq. ID No. 1) hat:

| | | | |
|--|-----|-----|----|
| TT TTCGTTCCA TCAGCCTACT | 22 | | |
| TGAGATGTAT TCCCACGGT AAAAGTTAAT TTTTTGATT TTTCGCGAGCA | | 72 | |
| | | | |
| ATG GTG TTC TAC CGT AGC GTT TCG TTG CTG TCA AAG CTC CGC TCT | | 117 | |
| Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| | | | |
| CGA GCG GTC CAA CAG TCA AAT GTT AGC AAT TCT GTG CGC TGG CTT | | 162 | |
| Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| | | | |
| CAA GTC CAA ACC TCT TCC GGT CTT GAT CTG CGT TCT GAG CTG GTA | | 207 | |
| Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| | | | |
| CAA GAA TTG ATT CCT GAA CAA CAG GAT CGC CTG AAA AAG ATC AAG | | 252 | |
| Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| | | | |
| TCA GAT ATG AAA GGT TCA ATT GGG AAC ATC ACA GTT GAT ATG GTT | | 297 | |
| Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val | | | |
| 65 | 70 | 75 | |
| | | | |
| CTT GGT GGA ATG AGA GGA ATG ACA GGA TTA CTG TGG AAA CCT CAT | | 342 | |
| Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His | | | |
| 80 | 85 | 90 | |
| | | | |
| TAC CTT GAC CCT GAT GAG GGA ATT CGC TTC CGG GGG TTG TCT ATA | | 387 | |
| Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile | | | |
| 95 | 100 | 105 | |

| | | |
|---|-----|-----|
| CCT GAA TGC CAA AAG GTA TTA CCT GCA GCA AAG CCT GGG GGT GAG | | 432 |
| Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu | | |
| 110 | 115 | 120 |
| CCC TTG CCT GAA GGT CTT CTC TGG CTT CTT TTA ACA GGA AAG GTG | | 477 |
| Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Thr Gly Lys Val | | |
| 125 | 130 | 135 |
| CCA TCA AAA GAG CAA GTG AAT TCA ATT GTC TCA GGA ATT GCA GAG | | 522 |
| Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu | | |
| 140 | 145 | 150 |
| TCG GGC ATC ATA TCC CTG ATC ATC ATG TAT ACA ACT ATT GAT GCC | | 567 |
| Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala | | |
| 155 | 160 | 165 |
| TTA CCA GTC ACA GCT CAT CCA ATG ACC CAG TTT GCT ACT GGA GTC | | 612 |
| Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val | | |
| 170 | 175 | 180 |
| ATG GCT CTT CAG GTT CAA AGT GAA TTT CAA AAG GCA TAC GAG AAA | | 657 |
| Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys | | |
| 185 | 190 | 195 |
| GGG ATT CAC AAA TCA AAG TAT TGG GAA CCA ACA TAT GAG GAT TCC | | 702 |
| Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser | | |
| 200 | 205 | 210 |
| ATG AAT CTG ATT GCT CAA GTT CCA CTT GTT GCT GCT TAT GTT TAT | | 747 |
| Met Asn Leu Ile Ala Gln Val Pro Leu Val Ala Ala Tyr Val Tyr | | |
| 215 | 220 | 225 |
| CGC AGG ATG TAC AAG AAT GGT GAC ACT ATA CCT AAG GAT GAA TCC | | 792 |
| Arg Arg Met Tyr Lys Asn Gly Asp Thr Ile Pro Lys Asp Glu Ser | | |
| 230 | 235 | 240 |
| CTG GAT TAT GGT GCA AAT TTT GCT CAC ATG CTT GGT TTC AGT AGC | | 837 |
| Leu Asp Tyr Gly Ala Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Ser Ser | | |
| 245 | 250 | 255 |

| | | |
|---|-----|------|
| TCT GAA ATG CAT GAA CTT CTT ATG AGG CTC TAT GTA ACA ATA CAC | | 882 |
| Ser Glu Met His Glu Leu Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His | | |
| 260 | 265 | 270 |
| <hr/> | | |
| AGT GAT CAT GAA GGT GGT AAT GTC AGT GCT CAC ACC GGT CAC TTG | | 927 |
| Ser Asp His Glu Gly Gly Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu | | |
| 275 | 280 | 285 |
| <hr/> | | |
| GTT GCT AGT GCT TTG TCT GAT CCT TAC CTC TCC TTT GCT GCT GCT | | 972 |
| Val Ala Ser Ala Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala | | |
| 290 | 295 | 300 |
| <hr/> | | |
| TTG AAT GGT TTA GCC GGA CCA CTT CAT GGT TTA GCC AAT CAG GAA | | 1017 |
| Leu Asn Gly Leu Ala Gly Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu | | |
| 305 | 310 | 315 |
| <hr/> | | |
| GTT TTG CTA TGG ATA AAA TCT GTT GTA GAA GAA TGT GGG GAG AAC | | 1062 |
| Val Leu Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn | | |
| 320 | 325 | 330 |
| <hr/> | | |
| ATT TCC AAA GAG CAG TTG AAA GAC TAT GTT TGG AAA ACA TTG AAC | | 1107 |
| Ile Ser Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Val Trp Lys Thr Leu Asn | | |
| 335 | 340 | 345 |
| <hr/> | | |
| AGT GGC AAG GTT GTC CCT GGT TTT GGA CAT GGA GTT CTG CGA AAG | | 1152 |
| Ser Gly Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys | | |
| 350 | 355 | 360 |
| <hr/> | | |
| ACT GTA CCA AGA TAT ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT ATG AAG CAT | | 1197 |
| Thr Val Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Met Lys His | | |
| 365 | 370 | 375 |
| <hr/> | | |
| TTG CCT GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT TCA AAA CTC TAC GAA | | 1242 |
| Leu Pro Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu | | |
| 380 | 385 | 390 |
| <hr/> | | |
| GTT TTC CTC CTG TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAA CCT TGG | | 1287 |
| Val Phe Leu Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Lys Pro Trp | | |
| 395 | 400 | 405 |

CCA AAT GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT 1332
 Pro Asn Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly
 410 415 420

TTA ACT GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGC GTA TCA AGA 1377
 Leu Thr Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg
 425 430 435

GCT CTT GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA 1422
 Ala Leu Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly
 440 445 450

TTG CCG CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG 1467
 Leu Pro Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu
 455 460 465

AAC CAG TGC AAG AAA GCA TGAATTGTTT GAAATCTCGC GAGCATAAAA 1515
 Asn Gln Cys Lys Lys Ala
 470

CACAATGTAT AATCTCTATG AATAATTGCT TGACAAAGCA CTCCTTCTT 1565

GGGGGACAAG ATAGGTCGGC CCTTCAATGG GTTAACGAAC TTCAGTTCAA 1615

ACTTCACTGA ATTTGTGTGA ATTGTATGGT TTCTCGAGAC TTGTCCTGAA 1665

TTTGAACTT AGTCTAGTGG ATTCAATTCTT CTTCAATTCCG AATTCCCTCAC 1715

ACGCTGATCC AGCATGTAAA AATTAATAGG TCAATGCTAT TAATCGCGTT 1765

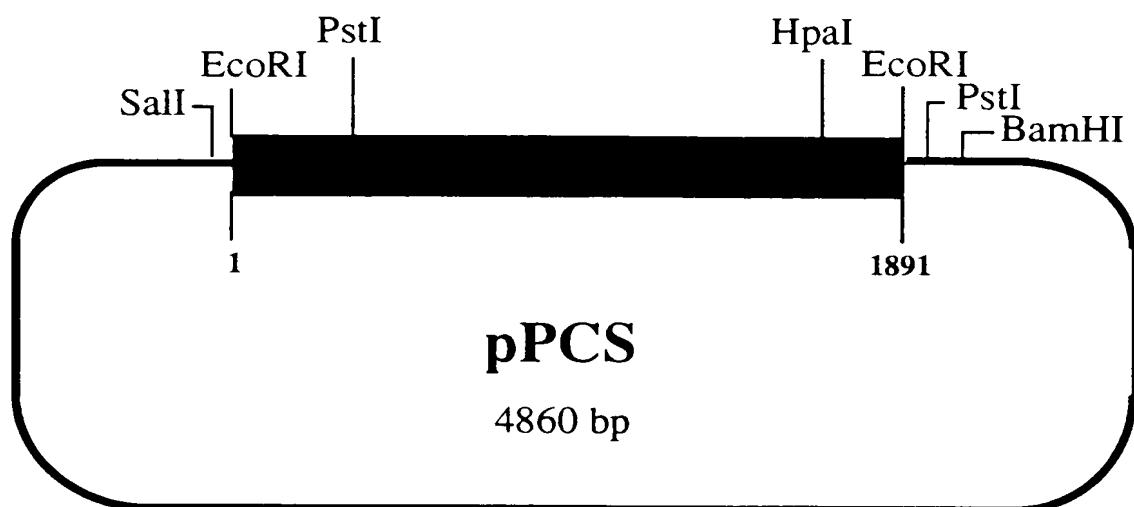
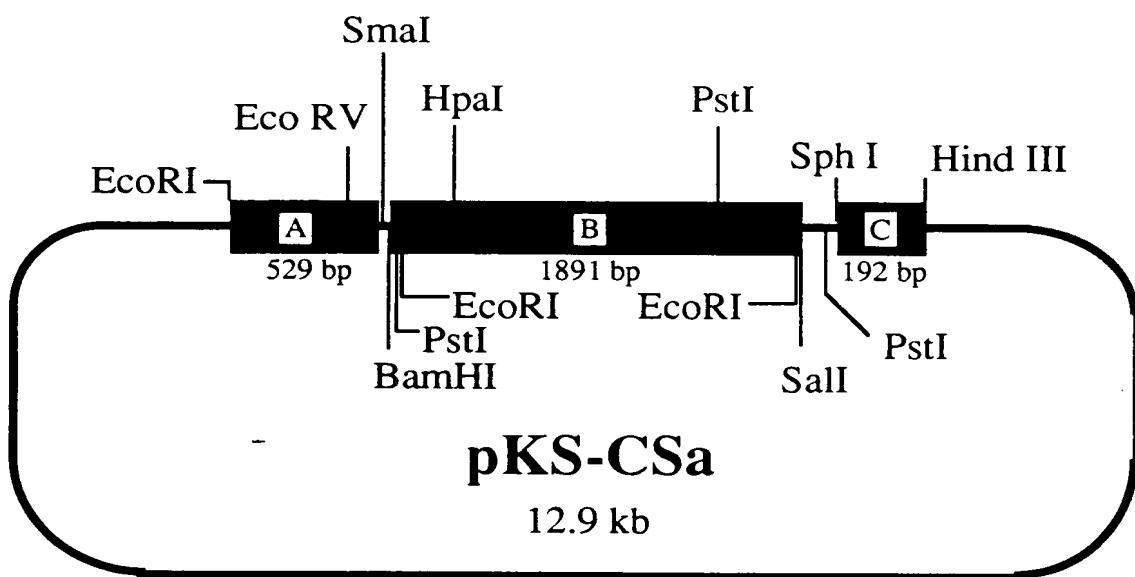
CTTGGTTGCC ATTAGACTTG TGAATGACTT CCTTTGCTGG AAAGTTAGTA 1815

ATCGGCTGAT TCACGCAATA AACTGCAATT GTGTAGTTTC TTAAATTGCA 1865

TAATTCTTAT TTGATGATAT TATGAA 1891

15. Ein Plasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüchen 10 bis 14 enthält.
16. Plasmid pPCS, das unter der DSM-Nr. 8879 hinterlegt wurde.
17. Plasmid pKS-CSa, das unter der DSM-Nr. 8880 hinterlegt wurde.
18. Die Verwendung der Plasmide gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 17 oder Derivate oder Teile davon zur Transformation pro- und eukaryontischer Zellen.
19. Bakterien, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14.
20. Bakterien enthaltend Plasmide gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 17.
21. Transgene Pflanzen, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 als Bestandteil rekombinanter DNA.
22. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 21 dadurch gekennzeichnet, daß ihre Citrat-Synthaseaktivität durch Anwesenheit einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14, die Bestandteil einer rekombinanten DNA ist, verändert ist.
23. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nutzpflanze ist.
-
24. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Kartoffel ist.
25. Verwendung von DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) kodieren, zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen.
26. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 in Kombination mit Steuerelementen für eine Expression in pro- und eukaryontischen Zellen.

27. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14 zur Expression einer nicht translatierbaren mRNA, die die Synthese einer endogenen Citrat-Synthase in den Zellen verhindert.
28. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 14 zur Isolierung ähnlicher Sequenzen aus dem Genom von Pflanzen.

**Fig. 1****Fig. 2**

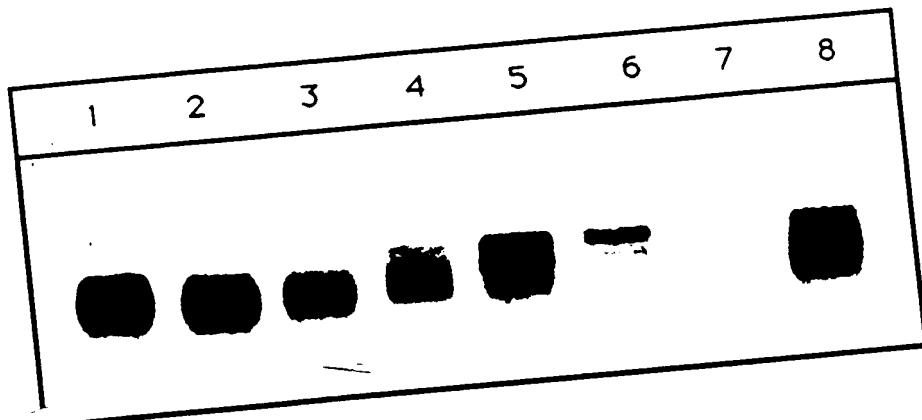


Fig. 3

Citralsynthase-Aktivität (in nmol/min/mg Protein) in verschiedenen Organen der Pflanzen und in Mitochondrien

| | Wildtyp | T55 | T50 | T6 | T29 |
|---------------|------------|------------|-----------|-----------|----------|
| Blätter | 55.6± 25.0 | 32.7± 25.0 | 15.1± 8.7 | 15.0± 7.7 | 3.2± 1.2 |
| | 100% | 58.8% | 27.1% | 27.0% | 5.8% |
| Knollen | 8.5± 3.4 | 4.9± 0.8 | 1.1± 0.3 | 1.6± 0.5 | 2.0± 0.8 |
| | 100% | 57.6% | 12.9% | 18.8% | 23.5% |
| Mitochondrien | 1788± 492 | 450± 120 | 265± 45 | 260± 50 | 193± 118 |
| | 100% | 25.2% | 14.8% | 14.5% | 9.3% |

Wildtyp= *Solanum tuberosum* cv. Désirée,
T55, T50, T6, T29= unabhängige, transgene Kartoffellinien

Fig. 4

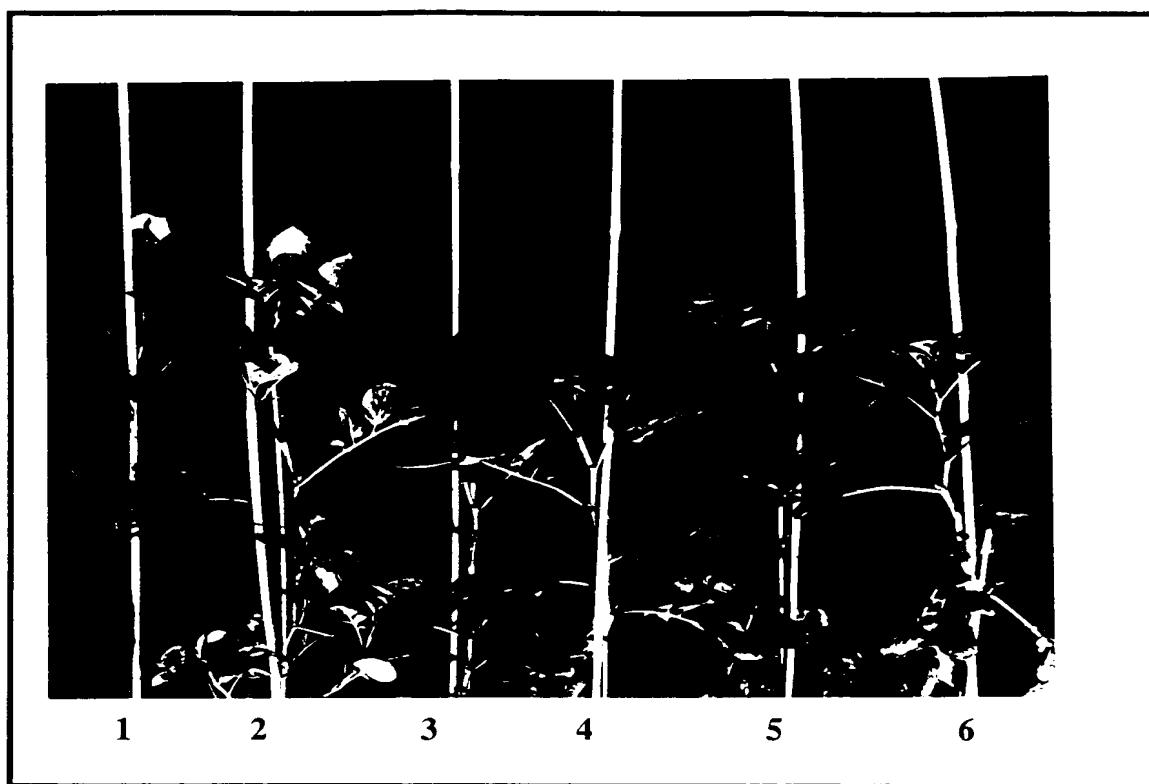


Fig. 5

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung bei Pflanzen, sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen beschrieben.

Des Weiteren werden DNA-Sequenzen, die bei Integration in ein pflanzliches Genom die Aktivität der Citrat-Synthase der Pflanze verändern, Plasmide, die diese DNA-Sequenz enthalten, sowie transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung der DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase hervorgerufen werden, beschrieben.

Bei den beschriebenen DNA-Sequenzen handelt es sich um Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, die für das Enzym Citrat-Synthase kodieren.

Die Erfindung beschreibt weiterhin transgene Kartoffelpflanzen, bei denen es aufgrund einer Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität zu einer Inhibierung der Blütenbildung, einer Verringerung der Lagerungsverluste der Knollen sowie einer Veränderung des Sprossungsverhaltens kommt.

